

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10004973 A**

(43) Date of publication of application: **13.01.98**

(51) Int. Cl      **C12N 15/09**  
**A61K 35/76**  
**C07H 21/04**  
**C12N 7/00**  
**//(C12N 7/00 , C12R 1:91 )**

(21) Application number: **08181513**

(22) Date of filing: **20.06.96**

(71) Applicant: **SUMITOMO PHARMACEUT CO LTD KOKURITSU KANSENSHIYOU KENKYUSHO**

(72) Inventor: **MATSUURA ZENJI  
SHIYOUJI IKUO  
SAITO IZUMI  
MIYAMURA TATSUO**

**(54) RECOMBINED VACUROVIRUS AND ITS UTILIZATION**

**(57) Abstract:**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a new recombinant vacuovirus having a promoter, a recombinase gene, and a poly A sequence, enabling to easily separate and purify an E2A gene-defected recombinant adenovirus for generic therapies, and useful for animal cell infections, etc.

**SOLUTION:** This new recombinant vacuovirus has a promoter, a recombinase gene and a poly A sequence. An E2A gene-defected recombinant adenovirus for genetic therapies is produced by infecting an animal cell with the recombinant vacuovirus and a recombinant adenovirus having two recombinase-recognizing sequences directed in the same directions and placed on both the sides of an adenovirus E2A gene region and subsequently cleaving the E2A gene of the recombinant adenovirus. the employment of the recombinant

vacuovirus enables to easily separate and purify the E2A gene-defected recombinant adenovirus. The recombinant vacuovirus is obtained by the transfection of a plasmid containing the promoter, the recombinase gene and the poly A sequence to a vacuovirus by a lipofection method, etc.

**COPYRIGHT:** (C)1998,JPO

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-4973

(43)公開日 平成10年(1998)1月13日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>  
C 12 N 15/09  
A 61 K 35/76  
C 07 H 21/04  
C 12 N 7/00  
// (C 12 N 7/00

識別記号 ZNA  
9282-4B  
ACN

F I  
C 12 N 15/00  
A 61 K 35/76  
C 07 H 21/04  
C 12 N 7/00

技術表示箇所  
Z NAA  
ACN  
B

審査請求 未請求 請求項の数 8 FD (全 20 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平8-181513

(22)出願日 平成8年(1996)6月20日

(71)出願人 000183370  
住友製薬株式会社  
大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号  
(71)出願人 591222245  
国立感染症研究所  
東京都新宿区戸山一丁目23番1号  
(72)発明者 松浦 善治  
埼玉県上福岡市福岡1丁目3番5-406号  
(72)発明者 勝二 郁夫  
東京都新宿区早稲田鶴巻町543 細谷ビル  
201号  
(74)代理人 弁理士 細田 芳徳

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 組換えバキュロウイルス及びその利用

(57)【要約】

【解決手段】プロモーター、リコンビナーゼ遺伝子およびポリA配列を有する組換えバキュロウイルス、および該組換えバキュロウイルスとアデノウイルスE2A遺伝子領域の両側に位置する同方向を向いた2つのリコンビナーゼ認識配列を有する組換えアデノウイルスを動物細胞に共感染させ、該組換えアデノウイルスの2つのリコンビナーゼ認識配列間に存するE2A遺伝子領域を切除することを特徴とするE2A遺伝子欠失組換えアデノウイルスの製造方法。

【効果】本発明の組換えバキュロウイルスを使用することにより、目的の組換えアデノウイルスの分離、精製が容易になる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 プロモーター、リコンビナーゼ遺伝子およびポリA配列を有する組換えバキュロウイルス。

【請求項2】 リコンビナーゼ遺伝子が大腸菌P1ファージ由来のリコンビナーゼCreの遺伝子である請求項1記載の組換えバキュロウイルス。

【請求項3】 プロモーターおよびポリAが、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニワトリβ-アクチンプロモーター、ウサギβグロビンのスプライシングアクセプターおよびポリA配列からなるハイブリッドプロモーター(CAGプロモーター)である請求項1又は2記載の組換えバキュロウイルス。

【請求項4】 プロモーター、リコンビナーゼ遺伝子およびポリA配列を有する組換えバキュロウイルスと、アデノウイルスE2A遺伝子領域の両側に位置する同方向を向いた2つのリコンビナーゼ認識配列を有する組換えアデノウイルスを動物細胞に共感染させ、該組換えアデノウイルスの2つのリコンビナーゼ認識配列間に存するE2A遺伝子領域を切除することを特徴とするE2A遺伝子欠失組換えアデノウイルスの製造方法。

【請求項5】 2つのリコンビナーゼ認識配列の挿入部位の一方が、アデノウイルスE2A遺伝子の終止コドンとアデノウイルスL3遺伝子の終止コドンの間であって、両遺伝子のポリA付加シグナルの機能を欠失しない範囲であることを特徴とする請求項4記載の製造方法。

【請求項6】 リコンビナーゼ遺伝子が大腸菌P1ファージ由来のリコンビナーゼCreの遺伝子である請求項4又は5記載の製造方法。

【請求項7】 リコンビナーゼ認識配列が大腸菌P1ファージ由来のリコンビナーゼCreの基質となる10×PのDNA配列(配列番号:1)である請求項4~6いずれか記載の製造方法。

【請求項8】 プロモーターおよびポリAが、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニワトリβ-アクチンプロモーター、ウサギβグロビンのスプライシングアクセプターおよびポリA配列からなるハイブリッドプロモーター(CAGプロモーター)である請求項4~7いずれか記載の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は動物細胞感染用の組換えバキュロウイルス及びその利用に関する。さらに詳しくは、リコンビナーゼ遺伝子発現用組換えバキュロウイルスと該ウイルスを用いた遺伝子治療用組換えアデノウイルスの製造法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 これまで遺伝子導入のウイルスベクターとしてレトロウイルスが良く用いられたが、このウイルスは分裂している細胞にしか導入できないことや宿主細胞の染色体に組み込まれてしまうことにより、特に遺伝

子治療においてはその安全性の観点より問題があり、その応用範囲は限られていると考えられている。アデノウイルスベクターは、種々の動物培養細胞で100%近い導入効率を示すこと、またレトロウイルスと異なり積極的な染色体組み込みの機構を持たないこと、さらに、休止期の細胞でも遺伝子導入出来るという利点もあり、外来遺伝子導入実験のベクターとしての応用範囲は極めて広く、近い将来は遺伝子治療の主要技術の一つとして確立するであろうと考えられている。

10 【0003】 アデノウイルスベクターの利用は遺伝子治療技術の一つとして、また神経系などの高度に分化した細胞での発現研究の面で急速に普及してきている。遺伝子治療技術としては、既に構築され機能している組織へ直接投与することにより機能を担っている生細胞へ直接欠損した遺伝子を補う、いわゆる *in vivo*法として研究が精力的に進められている。既に囊胞性纖維症では、米国で実際に患者への実験治療を認められており、筋ジストロフィー症、家族性高コレステロール血症、また脳腫瘍等に対して活発に研究されるようになった。

20 【0004】 しかし、アデノウイルスベクターはレトロウイルスベクターと異なり、積極的な染色体組み込みの機構を持たないことから、目的遺伝子の発現が一時的である。その期間は1~2週間から、長くても2ヶ月程度である。そのため治療効果を継続させる必要がある場合には、なるべく長期間細胞内でアデノウイルスベクターが安定に存在し、アデノウイルスベクター中に挿入された目的遺伝子が発現し続けることが望ましい。そして、最近、アデノウイルスゲノムのE2A遺伝子の機能を抑制することにより、目的遺伝子の発現期間が延長することがわかつてきた (Yangら、Nature Genetics, vol. 7, 362-369(1993))。

【0005】 一方、本発明者らは、アデノウイルスE2A遺伝子領域とL3遺伝子領域の間に外来ヌクレオチドを導入し得る領域が存在することを発見した。この領域には常法によりそのまま外来ヌクレオチドを導入することができるが、一旦適当なリンカーを常法により導入して必要な制限酵素部位を導入した後、外来ヌクレオチドを導入してもよい。外来ヌクレオチドとしては、動物細胞に感染させた後その細胞内で発現することが望まれる

30 【0006】 ポリペプチドをコードする外来遺伝子でもよく、またその外来ヌクレオチドがそのまま細胞中に共存する酵素の基質となるものであってもよい。さらに、本発明者らは、上記の領域に外来ヌクレオチドとしてリコンビナーゼの認識配列を導入することにより、動物細胞内で発現しうるリコンビナーゼ遺伝子を挿入した動物細胞感染用の組換えアデノウイルスベクターと併用すれば動物細胞内でアデノウイルスゲノムのE2A遺伝子領域を欠失させることができるようなアデノウイルスベクターの系を構築した。

40 【0007】 一方、本発明者らは、アデノウイルスE2A遺伝子領域とL3遺伝子領域の間に外來ヌクレオチドを導入し得る領域が存在することを発見した。この領域には常法によりそのまま外來ヌクレオチドを導入することができるが、一旦適当なリンカーを常法により導入して必要な制限酵素部位を導入した後、外來ヌクレオチドを導入してもよい。外來ヌクレオチドとしては、動物細胞に感染させた後その細胞内で発現することが望まれる

【0008】 ポリペプチドをコードする外來遺伝子でもよく、またその外來ヌクレオチドがそのまま細胞中に共存する酵素の基質となるものであってもよい。さらに、本発明者らは、上記の領域に外來ヌクレオチドとしてリコンビナーゼの認識配列を導入することにより、動物細胞内で発現しうるリコンビナーゼ遺伝子を挿入した動物細胞感染用の組換えアデノウイルスベクターと併用すれば動物細胞内でアデノウイルスゲノムのE2A遺伝子領域を欠失させることができるようなアデノウイルスベクターの系を構築した。

50 【0009】 ここに、リコンビナーゼとは、特異的なD

NA組換え酵素で、数十塩基からなる特異的なDNA配列を認識し、この配列間でDNAの切断・鎖の交換と結合の全行程を行う。そこで、この酵素を発現する組換えアデノウイルスベクターと、E2A遺伝子領域の両側にこの認識配列と同じ向きに2コピーを持つ組換えアデノウイルスベクターを作製し、両組換えウイルスを細胞（例えば、ヒト胎児腎由来の293細胞）に共感染させると、発現したリコンビナーゼにより2つの認識配列間の再構成が起き、挟まれた部分が環状分子として切り出される。従って、こうして得られるE2A遺伝子領域を欠失した組換えアデノウイルスは、E2A遺伝子領域を含む組換えアデノウイルスに比して顕著に安定になり、遺伝子治療に有利に使用できると期待できる。

#### 【0007】

【発明が解決しようとする課題】上記の方法により得られる目的のE2A遺伝子欠失組換えアデノウイルスを単離するには、最終的にリコンビナーゼ発現組換えアデノウイルスと目的のE2A遺伝子欠失組換えアデノウイルスを分離する操作が必要になる。両者はCsClの密度平衡遠心分離法での分離が可能であるものの、わずかな密度の違いでの分離は高度な技術を要し、目的のE2A遺伝子欠失組換えアデノウイルスを分取する際、リコンビナーゼ発現組換えアデノウイルスが混入するおそれがあった。

#### 【0008】

【課題を解決するための手段】そこで、本発明者らは上記の問題を解決するために鋭意検討し、ヒト胎児腎由来のアデノウイルスE1AおよびE1Bを発現している293細胞にリコンビナーゼを供給する方法としてバキュロウイルス (AcNPV) ベクターが適していることを見出した。昆虫細胞を宿主とし、バキュロウイルスベクターを用いた遺伝子発現系は、ウイルスの強力な多角体プロモーターを利用できるため、きわめて効率よく発現産物を生成し、また多くの場合本来の生物活性を保持することができる。また最近、バキュロウイルス (AcNPV) はヒト肝由来細胞には効率良く感染し、種々の外来プロモーターからレポーター遺伝子が効率良く発現するのに対し、他の細胞には感染効率が低いことが明らかにされた (Hofmann C. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 92, 10099-10103, 1995 ; Boyce M.F. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 2348-2352, 1996) が、本発明者らは、293細胞に対しても十分な感染が見られ、リコンビナーゼ発現組換えバキュロウイルスを感染させた293細胞中で十分量のリコンビナーゼが産生されることを見出した。感染293細胞中では、目的のE2A遺伝子欠失組換えアデノウイルスとリコンビナーゼ発現組換えバキュロウイルスが混在するが、後者は25000×g、60分間の遠心分離により沈澱物として回収された。一方、組換えアデノウイルスは同じ遠心条件で上清画分に存在するため、両ウイルスは簡単に分離するこ

とができる、上記の問題を解決することができた。

【0009】即ち、本発明の要旨は、(1) プロモーター、リコンビナーゼ遺伝子およびポリA配列を有する組換えバキュロウイルス、(2) リコンビナーゼ遺伝子が大腸菌P1ファージ由来のリコンビナーゼC<sub>re</sub>の遺伝子である前記(1)記載の組換えバキュロウイルス、(3) プロモーターおよびポリAが、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニワトリβ-アクチングリコナーゼ遺伝子、ウサギβグロビンのスプライシングアクセプターおよびポリA配列からなるハイブリッドプロモーター

(CAGプロモーター) である前記(1)又は(2)記載の組換えバキュロウイルス、(4) プロモーター、リコンビナーゼ遺伝子およびポリA配列を有する組換えバキュロウイルスと、アデノウイルスE2A遺伝子領域の両側に位置する同方向を向いた2つのリコンビナーゼ認識配列を有する組換えアデノウイルスを動物細胞に共感染させ、該組換えアデノウイルスの2つのリコンビナーゼ認識配列間に存するE2A遺伝子領域を切除することを特徴とするE2A遺伝子欠失組換えアデノウイルスの製造方法、(5) 2つのリコンビナーゼ認識配列の挿入部位の一方が、アデノウイルスE2A遺伝子の終止コドンとアデノウイルスL3遺伝子の終止コドンの間であって、両遺伝子のポリA付加シグナルの機能を欠失しない範囲であることを特徴とする前記(4)記載の製造方法、(6) リコンビナーゼ遺伝子が大腸菌P1ファージ由来のリコンビナーゼC<sub>re</sub>の遺伝子である前記(4)又は(5)記載の製造方法、(7) リコンビナーゼ認識配列が大腸菌P1ファージ由来のリコンビナーゼC<sub>re</sub>の基質となるLoxPのDNA配列(配列番号: 1)である前記(4)～(6)いずれか記載の製造方法、(8) プロモーターおよびポリAが、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニワトリβ-アクチングリコナーゼ遺伝子、ウサギβグロビンのスプライシングアクセプターおよびポリA配列からなるハイブリッドプロモーター(CAGプロモーター)である前記(4)～(7)いずれか記載の製造方法、に関する。

#### 【0010】

【発明の実施の形態】昆虫に感染して病気を起こすウイルスであるバキュロウイルスは、環状の二本鎖DNAを

40 遺伝子としてもつエンベロープウイルスで、鱗翅目、膜翅目および双翅目などの昆虫に感受性を示す。バキュロウイルスの中で、感染細胞の核内に多角体(ポリヒドロ)と呼ばれる封入体を大量につくる一群のウイルスが核多角体病ウイルス(NPV)である。多角体は、分子量31kDaのポリヘドリンタンパクより構成され、感染後期に大量につくられその中に多数のウイルス粒子を埋め込んでいる。多角体はウイルスが自然界で生存するためには必須であるが、ウイルスの増殖そのものには必要ないので、多角体遺伝子の代わりに発現させたい外来遺伝子を挿入してもウイルスは全く支障なく感染し増殖

する。

【0011】本発明で用いられるバキュロウイルスは、NPVのキンウワバ科のオートグラファ カリフォルニカ (*Autographa californica*) NPV (AcNPV) やカイコのポンビックス モリ (*Bombyx mori*) NPV (BmNPV) の2つのウイルスがベクターとして主に用いられ、それぞれウイルスの感染、継代細胞として、スピドプテラ フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞 (Sf細胞)、BmN4細胞などが入手、購入可能である。Sf細胞は、BmN4細胞などに比べ増殖速度が速いこと、また、AcNPVはヒト肝細胞およびヒト胎児腎細胞などにも感染する能力を有することから、AcNPV系のベクターが好ましい。AcNPV系のトランスマーカーとして、本発明者らは、pAcYM1 (Matsuura, Yら、*J. Gen. Virol.*, 68, 1233-1250, 1987) (図6) を利用した。他の多くのベクターは、NERCウイルス研究所 (オックスフォード、UK) のポッセ博士 (Dr. R. D. Possee) より入手可能である。組換えバキュロウイルス作製のためのウイルスDNAは、野生型ウイルスまたはLaCZ遺伝子を組み込んだウイルス (図7) のいずれでも構わないが、組換えバキュロウイルスの識別の容易さにより、LaCZ遺伝子を組み込んだウイルスが好ましい。

【0012】本発明で用いられるアデノウイルスは、動物を自然宿主とするものであり、特にヒトを宿主とするヒトアデノウイルスが好適に用いられる。ヒトアデノウイルスのゲノムは、約36kbの2本鎖線状DNAであって、DNA鎖両端にはおよそ100bpからなる逆方向反復塩基配列があり、そのDNA鎖両端の5'末端にはE2B遺伝子産物が切断加工された55kのタンパク質が共有結合しているという特異な構造をしている。

【0013】本発明で用いられるアデノウイルスのゲノムは、E1遺伝子領域特にE1A遺伝子領域を欠失していることが好ましい。これは、アデノウイルスの細胞ガン化活性に関与するE1A遺伝子領域を欠失させることにより、アデノウイルスを無毒化し、ゲノム中に組み込んだ外来の遺伝子配列のみを発現させるためである。必ずしもE1A遺伝子領域の全てを欠失させる必要はないが、例えば1.3~9.3%の断片を除去すれば、目的は達成される。このようにE1遺伝子領域を欠失しているアデノウイルスは、ヒト胎児腎由来細胞株293細胞のようなE1A、E1B遺伝子を持続的に発現している細胞株を除き、宿主細胞内で増殖することができないという特徴を有する。また、本発明で用いられるアデノウイルスのゲノムは、E3遺伝子領域を欠失させてもよい。特に、E3遺伝子領域の79.6~84.8%を欠失させたものが好ましい。アデノウイルスの複製には不要であるからである。

【0014】ところで、実際にヒトや動物に投与した場合、E1A蛋白と同様の機能を有する蛋白が細胞中に存

在し、これによりわずかにアデノウイルス蛋白が発現する。これが細胞免疫を引起し、ウイルスDNAを保持する細胞が攻撃を受け排除されることがわかっている。現在使用されているE1A、E1B欠損型アデノウイルスベクターによる遺伝子発現が短期間である原因はここにある。これを防ぐためには、E2A遺伝子の機能を欠失させることが有効であることがYanagらにより明らかにされた (*Nature Genetics*, vol. 7, 362-369, 1993)。

これは、温度感受性のE2A遺伝子変異株を利用したものであるが、動物に投与した場合、E2A遺伝子の機能発現が抑制されるものの機能発現を完全に止めることができない。E2A遺伝子の機能発現を完全に止める手段としてはE2A遺伝子領域を欠失させることが考えられる。

【0015】本発明は、E2A遺伝子の両端にリコンビナーゼ認識配列を配置した組換えアデノウイルスとリコンビナーゼ発現用バキュロウイルスを動物培養細胞に共感染させ、細胞内で発現したリコンビナーゼによりE2A遺伝子欠失型感染性ウイルス粒子を作製するというものである。得られるE2A遺伝子欠失型ウイルスはE2A遺伝子の発現が皆無であるため、目的とする遺伝子の発現期間が大幅に延長することは間違いない。

【0016】リコンビナーゼの認識配列の挿入位置は、E2A遺伝子領域の右側 (図1参照) すなわちE3領域内には従来から知られている領域があるが、E2A遺伝子領域の左側については、E2A遺伝子の終止コドンとL3遺伝子の終止コドンの間であって、得られる組換えアデノウイルスの増殖を阻害しない部位が選択される。E2A遺伝子領域やL3遺伝子領域の一部欠失あるいはポリA付加シグナル領域が一部欠失することになると、得られる組換えアデノウイルスの増殖が阻害されるため好ましくない。

【0017】本発明で用いられるプロモーターとしては、動物ウイルス遺伝子プロモーターおよび動物細胞遺伝子プロモーターが挙げられる。前者の例としてはSV40遺伝子プロモーター、アデノウイルス主要後期遺伝子プロモーター、等があり、また、後者の例としては、チミジンキナーゼ遺伝子プロモーター、メタロチオネイン遺伝子プロモーター、免疫グロブリン遺伝子プロモーター等がある。しかし本発明には、CAGプロモーターが特に有利に用いられる。このプロモーターは、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニワトリβ-アクチングロモーター、ウサギβグロビンのスプライシングアクセプターおよびウサギβグロビン由来のポリA配列からなるハイブリッドプロモーターであり、高発現ベクターとして特開平3-168087、13頁20行~20頁14行および22頁1行~25頁6行) から制限酵素SalI, HIndIIIで切り出すことにより行うことができ、本発

明に利用することができる。

【0018】本発明に用いられるリコンビナーゼは、特異的なDNA組換え酵素で、特定の塩基配列を認識し、この配列間でDNAの切断、鎖の交換と結合の全行程を行う。かかる酵素としては、大腸菌のバクテリオファージP1がコードするもの（リコンビナーゼCre）がある。これはバクテリオファージP1内のloxP（Abremskiら、J. Biol. Chem. 1984、1509-1514；およびHoeßら、P.N.A.S.、1984、81、1026-1029）配列を基質とする。即ち、loxP配列がリコンビナーゼCreの認識配列となる。また、他のリコンビナーゼとして酵母の2μプラスミド由来のFLP遺伝子がコードするリコンビナーゼが挙げられる（James R. Broachら、Cell、29、227-234）。さらに、チゴサッカロマイセス・ルーアイのpSR1プラスミド由来のものも使用できる。これはR遺伝子にコードされる（Matsuzakiら、Molecular and Cellular Biology、8、955-962（1988））。これらの中では、バクテリオファージP1のリコンビナーゼが本発明に特に好適である。

【0019】リコンビナーゼ遺伝子は、例えば、リコンビナーゼCre遺伝子の場合は、バクテリオファージP1のDNAのリコンビナーゼ遺伝子をコードする部分をポリメラーゼ・チエイン・リアクション（PCR）法を用いて増幅して本発明に使用することができる。他のリコンビナーゼ遺伝子の場合も同様にPCR法を用いて調製することができる。この場合に使用するプライマーは、リコンビナーゼ遺伝子の全配列がカバーされるように選択され、さらに組換えバキュロウイルスベクターの構築の便宜のため、各プライマーの外側に適当な制限酵素切断配列を付加したものを使用することが好ましい。

【0020】上記のリコンビナーゼの認識配列（基質となる配列）は数十bpであり、例えばloxP配列は34bpであり、全て、塩基配列が知られている（Abremskiら、J. Biol. Chem. 1984、1509-1514；およびHoeßら、P.N.A.S.、1984、81、1026-1029）、常法により化学合成して本発明に使用することができる。

【0021】本発明に用いられるポリA配列としては、特に限定されるものでないが、ウサギβグロビン由來のものが特に好ましい。

【0022】本発明においては、リコンビナーゼ遺伝子をバキュロウイルスベクターに組み込む場合に、同時に核移行シグナル配列を組み込むことが好ましい。例えば、SV40の核移行シグナルが利用できる。これは、バキュロウイルスベクターにより感染細胞の細胞質内で発現したリコンビナーゼがその認識配列を有するアデノウイルスベクターに作用するには、核内に移行する必要があり、核移行シグナル配列はこれを促進する（Daniel Kalderonら、Cell. 39、499-509（1984））からである。

【0023】本発明に使用される外来遺伝子としては、上記のハイブリッドプロモーター（CAGプロモーター）あるいはその他のプロモーターにより発現することができる遺伝子であれば、特に限定されるものではなく、有用性の観点から、ヒトの欠損遺伝子に対応する正常遺伝子の配列（例えばアデノシンデアミナーゼ、ジストロフィン、低密度リポ蛋白レセプター、α-1アンチトリプシン、血液凝固第8因子、血液凝固第9因子、ガラクトシダーゼα、もしくはβ）、サイトカイン類（例えばインターロイキン-1～12、インターフェロン-α、βもしくはγ、腫瘍壞死因子-αもしくはβ、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、エリスロポエチン、成長ホルモン、インシュリン、インシュリン様成長ホルモン）、神経栄養因子類、非自己抗原遺伝子（例えばアロHLA（HLA-B7））、ウイルス抗原等をコードするヌクレオチド配列、ガン抑制遺伝子（例えば、p53、RB、WT-1、NM23、NF-1）、ガン遺伝子であるras等のアンチセンス配列、またはチミジンキナーゼやシトシンデアミナーゼのような自殺遺伝子と呼ばれるものが挙げられる。

【0024】本発明の組換えアデノウイルスベクターに組み込まれるプロモーター、外来遺伝子およびポリA配列は上流からこの順に配向していくても逆の順に配向していくてもよい。本発明において、組換えバキュロウイルスと組換えアデノウイルスを共感染させる動物細胞としては、ヒト、マウス、ラット等の哺乳類由來の細胞が挙げられ、両ウイルスが効率よく感染する細胞が用いられる。E1遺伝子欠失組換えアデノウイルスを用いる場合には、E1A、E1B遺伝子を持続的に発現している動物細胞が好ましく、例えば293細胞が挙げられる。

【0025】次に、本発明の組換えアデノウイルスの製造方法について説明する。

（1）まず、E2A遺伝子領域の両側にある同方向を向いた二つのリコンビナーゼ認識配列、プロモーター、外来遺伝子およびポリA配列を有する組換えアデノウイルスの製造方法について述べる。便宜上、リコンビナーゼとしてはリコンビナーゼCreを、その認識配列としてはloxPを、プロモーターおよびポリA配列としては前記のCAGプロモーターを、外来遺伝子としてはlacZ遺伝子を使用する場合について述べるが、他のリコンビナーゼ、その認識配列、プロモーターおよびポリA配列を使用する場合も実質的に同様の手法を利用することができる。

【0026】（a）（pAdex1CAwtの構築）

① CAGプロモーターを含むプラスミドpCMwCH31の構築

CAGプロモーターを含むプラスミドpCAGGS（Niwaら、Gene, 108, 193-200(1990)）をEcoRIで切断した後、Klenow酵素により平滑化し、SwaI

リンカーとのリガーゼ反応を行う。次に、得られたプラスミドを *S a l I* で切断した後、*K l e n o w* 酵素により平滑化し、*C l a I* リンカーとのリガーゼ反応を行う。さらに、得られたプラスミドを *P s t I* で切断した後、*K l e n o w* 酵素により平滑化し、*X h o I* リンカーとのリガーゼ反応を行い、*C A G* プロモーターを含むプラスミド *p C M w C H 3 1* を取得する。元の制限酵素部位の消失および各リンカーの挿入は各制限酵素切断の後、アガロースゲル電気泳動により確認する。

【0027】② *p A d e x 1 c* の構築

*E 1* 遺伝子領域を欠失したアデノウイルスゲノム左側末端の 17% を含むプラスミド (*p U A F 0 - 1 7 D*)、5型アデノウイルスDNAに *B a m H I* リンカーを結合させた後 *H i n d III* 消化して得られるフラグメント (2. 8 kb、アデノウイルスゲノムの左側末端の 8% に当たる) を *p U C 1 9* に挿入して得られるプラスミド (*p U A F 0 - 8*)、およびアデノウイルスDNAを *H i n d III* 消化して得られる 3. 4 kb フラグメント (アデノウイルスゲノムの左側末端の 8-17% に当たる) を *p U C 1 9* の *H i n d III* 部位へ挿入して得られるプラスミド (*p U A F 8 - 1 7*) とを調製し、ついで *p U A F 0 - 8* 由来の 454 bp の *B a m H I - C l a I* フラグメントと、*p U A F 8 - 1 7* 由来の 2. 9 kb の *H i n d III - C l a I* フラグメントをつなぎ、*p U C 1 9* の *B a m H I / H i n d III* 部位へ挿入して *p U A F 0 - 1 7 D* を得る。

【0028】さらに、5型アデノウイルスDNAを *B s t 1 1 0 7* と *E c o R I* で消化し 21. 6 kb のフラグメントを得る。また、アデノウイルスゲノム由来の *p X 2 W* の *E c o R I - S a l I* フラグメント (6. 5 kb) を調製する。一方、charomid 9-11 (I. Saito & G. Stark, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 83, p8664-8668, 1986) を *A s p 7 1 8* と *B a m H I* で消化し、*K l e n o w* 酵素で平滑化後、セルフライゲーションする。ついでその *E c o R I* 部位へ *B a m H I* リンカーを挿入し、シャロミドを *c h d R B R 7 - 1 1* を調製する。

【0029】上記の *p U A F 0 - 1 7 D* の *B a m H I - B s t 1 1 0 7* フラグメント (2. 9 kb) とアデノウイルスゲノムの *B s t 1 1 0 7 - E c o R I* フラグメント (21. 6 kb) と *p X 2 W* の *E c o R I - S a l I* フラグメント (6. 5 kb) を *E c o R I* と *E c l 3 6 I* で消化した *c h d R B R 7 - 1 1* とライゲーションする。その後、*in vitro* パッケージングし、*D H 5 α* へ感染させる。形質転換株から目的のフラグメントをもつものを単離し、*p A d e x 1 c* と名づける。

【0030】③ カセットコスミド *p A d e x 1 c w* の構築

*C l a I* で切断した後エタノール沈殿により回収した *p A d e x 1 c* と、5' 末端リン酸化を施した下記の合成

リンカー (1) (配列番号: 2) (*S w a I*、*C l a I*、*S a l I*、*N r u I* 部位を含む) を混合し、*A T P*、*T 4 DNA* リガーゼを含む反応液中で一晩結合させる。リガーゼを熱失活させた後、*S w a I* で消化する。この切断はリンカーが複数個挿入されたものから *S w a I* 断片を切り出し、リンカーが 1 個のみ挿入された構造のコスミドを得るために行う。次に、反応液を *S p u n c o l u m n* (Pharmacia 社製) にかけ、リンカー由来の小断片を除去した後、*T 4 DNA* リガーゼでライゲーションを行い、セルフアニーリングによる環状化を行う。ついでイン・ビトロ・パッケージングを行い、各コロニーから調製したコスミドDNAの構造を *B a m H I* および *N r u I* 同時消化により確認する。目的とする方向に挿入された場合 483 bp、逆方向に挿入された場合、464 bp の断片を生じる。この確認により目的とするカセットコスミド *p A d e x 1 c w* (図 1) を取得する。

合成リンカー

(1) 5'-CGATTTAAATCGATTGTCGACTCGCGA-3'

20 3'-TAAATTAGCTAACAGCTGAGCGCTGC-5'

【0031】④ カセットコスミド *p A d e x 1 p C A w* の構築

①で構築したプラスミド *p C M w C H 3 1* を *H i n d II I* および *C l a I* で同時消化し、*K l e n o w* 酵素により平滑化し、5' 末端リン酸化を施した *P m e I* リンカーとのライゲーションを行う。リガーゼを熱失活させた後、*P s p 1 4 0 6 I* で消化する。この切断はリンカーが複数個挿入されたものから *P s p 1 4 0 6 I* 断片を切り出し、リンカーがDNA断片の両端にそれぞれ 1 個連結した構造の断片を得るために行う。このあと、反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、2. 3 kb のDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収する。次に、*p A d e x 1 c w* を *C l a I* で切断した後、生じた小断片を *S p u n c o l u m n* (Pharmacia 製) により除去した後のDNA断片と前述の 2. 3 kb のDNA断片を *T 4 DNA* リガーゼでライゲーションさせる。リガーゼを熱失活させた後、*C l a I* を添加し、セルフアニーリングにより生じた環状コスミドを切断する。ついで、イン・ビトロ・パッケージングに用いる。

【0032】更に、各コロニーから調製したコスミドDNAの構造を *B a m H I* および *X h o I* 同時消化により確認する。目的とする方向に挿入された場合 483 bp と 4. 8 kb、逆方向に挿入された場合、2. 7 及び 2. 5 kb の断片を生じる。この確認により目的とするカセットコスミド *p A d e x 1 p C A w* を取得する。

【0033】⑤ カセットコスミド *p A d e x 1 C A w t* (細胞工学、Vol. 13、No. 8、P 759) の構築

*S w a I* で切断した後エタノール沈殿により回収した *p A d e x 1 p C A w* を、5' 末端リン酸化を施した下記の

合成リンカー(2) (配列番号: 3) (C<sub>1</sub>a I, X<sub>b</sub> a I, S<sub>p</sub>e I, P<sub>a</sub>c I, S<sub>w</sub>a I, C<sub>1</sub>a I部位を含む)を混合し、ATP、T4DNAリガーゼを含む反応液中で一晩結合させる。リガーゼを熱失活させた後、P<sub>a</sub>c I (20 unit)を添加し、反応させる。この切断はリンカーが複数個挿入されたものからP<sub>a</sub>c I断片を切り出し、リンカーが1個のみ挿入された構造のコスミドを得るために用いる。次に、反応液をS<sub>p</sub>u n c o l u m n (Pharmacia製)にかけ、リンカー由来の小断片を除去した後、T4DNAリガーゼを含む反応液中で一晩結合させ、セルフアニーリングによる環状化を行う。リガーゼを熱失活させた後、イン・ビトロ・パッケージングに用いる。次に、各コロニーから調製したコスミドDNAの構造をX<sub>b</sub> a IおよびX<sub>h</sub> o I同時消化により確認する。目的とする方向に挿入された場合552 bp、逆方向に挿入された場合、568 bpの断片を生じる。これを確認することにより目的とするカセットコスミドpA<sub>d</sub>e<sub>x</sub>1CAwt(図2)を取得する。

#### 合成リンカーの構造

(2) 5'-ATCGATTCTAGACTAGTTAATTAAATTAAATCGAT-3'  
3'-TAGCTAAGATCTGATCAAATTAATTAAATTAGCTA-5'

【0034】(b) (1 o x P挿入コスミドの構築その1)

#### pA<sub>d</sub>e<sub>x</sub>2L3LCAwtの作製

##### ① pA<sub>6</sub>0X99Xの作製

pA<sub>d</sub>e<sub>x</sub>1CAwtをBamHIで切断した後、熱処理によりBamHIを失活させる。次にT4DNAリガーゼにより一晩結合させる。次いでこの反応混液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$  (GIBCO BRL製)を形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、目的とするプラスミドpA<sub>6</sub>0X99Xを得る。

【0035】② pA<sub>6</sub>0X99の作製 (アデノウイルス以外のX<sub>b</sub> a I部位の除去)

pA<sub>6</sub>0X99XをX<sub>b</sub> a I処理し、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、2ヶ所のX<sub>b</sub> a I部位のうち1ヶ所のみで切断された23.8 kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収する。次に、この断片をKlenow酵素(宝酒造製)で両末端を平滑化し、T4DNAリガーゼで一晩結合させる。次いでこの反応混液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ を形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製する。これらのプラスミドDNAをBsrGIおよびX<sub>b</sub> a Iで同時消化し、6.2 kbの断片すなわちプラスミドpA<sub>6</sub>0X99(図3)を得る。

【0036】③ pA<sub>2</sub>L60X99の作製 (BsrGI部位への1 o x Pの挿入)

pULL2rをXholで切断した後、Klenow酵素(宝酒造製)で両末端を平滑化する。その後フェノール:クロロホルム(1:1)処理を施した後、エタノー

ル沈澱する。沈澱物を遠心分離により取得し、TE60 $\mu$ lに溶解する。これと5'末端リン酸化KpnIリンカ (宝酒造製)、ATPおよびT4DNAリガーゼを含むリガーゼ反応液(最終容量50 $\mu$ l)中で一晩結合させる。次に、Asp718(ベーリンガー製)で消化する。反応混液をアガロースゲル電気泳動し、1oxPを含む64 bpのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収する。

【0037】なお、上記のpULL2rは以下のように

10 して調製する。pUC119(宝酒造製)を制限酵素E<sub>c</sub>1136IIで切断し、アルカリホスファターゼ処理を施した後、末端にMluI部位およびXhoI部位を有しこれが連結するとNruI部位を生じるように設計されている1oxP配列を含む下記の合成DNA断片(配列番号: 4)とのligation反応を行い該合成DNA断片が2つ挿入されたプラスミドpULL2rを得る。

5'-CGAACCGTATAACTCGTATAGCATACATTACAGAAGTTATCTCG  
AGTCG-3'

3'-GCTTGCGCATATTGAAGCATATCGTATGTAATATGCTTCAATAGAGC

20 TCAGC-5'

(下線部分の配列が1oxP部位である。)

【0038】一方、プラスミドpA<sub>6</sub>0X99(10 $\mu$ g)をBsrGI(50 unit)を含む反応系50 $\mu$ l中で切断した後、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、23.8 kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収する。このDNA断片と前述の1oxPを含む64 bpのDNA断片、ATPおよびT4DNAリガーゼを含むリガーゼ反応液中で一晩結合させる。これに滅菌水、BsrGI反応bufferを加え、70°Cで10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた後、BsrGIで処理してセルフアニーリングにより生じた環状のpA<sub>6</sub>0X99を切断する。次いでこの反応混液10 $\mu$ lを用いて大腸菌DH5 $\alpha$ を形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製する。

【0039】挿入された1oxPの方向を確認するため、ApAIとMluIの同時消化を行い、反応混液をアガロースゲル電気泳動する。目的とする方向に挿入された場合、366および219 bp、逆方向に挿入された場合、334および251 bpの断片が生じる。また、NruIで消化した場合、目的とする方向に挿入された場合573 bp、逆方向に挿入された場合、533 bpの断片が生じる。さらに、DraIとKpnIで同時消化した場合、目的とする方向に1oxPが1つ挿入された場合320 bp、2つ挿入された場合、384 bpの断片が生じる。これら3種の条件をすべて満たす、すなわち、目的とする方向に1oxPが1つ挿入された目的のプラスミドpA<sub>2</sub>L60X99(図4)を取得する。

40 40 【0040】④ pA<sub>2</sub>L3L6099の作製(Xba

I 部位への  $1 \circ x P$  の挿入)

p ULL2r を Xho I を含む反応系  $100 \mu l$  中で切断した後、Klenow 酵素（宝酒造製）で両末端を平滑化する。ついで、フェノール：クロロホルム（1：1）処理を施した後、エタノール沈殿する。沈殿物を遠心分離により取得し、TE に溶解する。これと 5' 末端リシン酸化 Spe I リンカー（宝酒造製）、ATP および T4 DNA リガーゼを含む反応液中で一晩結合させる。さらに、Spe I を加え消化した後、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、 $1 \circ x P$  を含む  $64 \text{ bp}$  の DNA 断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルから DNA 断片を回収する。

【0041】一方、p A2L60X99 を、Xba I で切断した後、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、2.3.  $8 \text{ kb}$  の DNA 断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルから DNA を回収する。この DNA 断片と前述の  $1 \circ x P$  を含む  $64 \text{ bp}$  の DNA 断片、ATP および T4 DNA リガーゼを含む反応液中で一晩結合させる。リガーゼを熱失活させ、ついでこれを Xba I で処理し、セルフアニーリングにより生じた環状の p A2L60X99 を切断する。この反応混液を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  を形質転換し、得られた形質転換体からプラスミド DNA を調製する。

【0042】挿入された  $1 \circ x P$  の方向を確認するため、Bgl II と Mlu I の同時消化を行い、反応混液をアガロースゲル電気泳動する。目的とする方向に挿入された場合、3.6.6 および 5.0.3 bp、逆方向に挿入された場合、3.9.8 および 4.7.1 bp の断片が生じる。また、Apa I と Mlu I で同時消化した場合、目的とする方向に挿入された場合 6.6.0 bp、逆方向に挿入された場合、6.2.8 bp の断片が生じる。EcoNI と Mlu I で消化した場合、目的とする方向に挿入された場合 3.1.1 bp、逆方向に挿入された場合、3.4.3 bp の断片が生じる。さらに、Hpa I と Sac I で同時消化した場合、目的とする方向に  $1 \circ x P$  が 1 つ挿入された場合 3.9.7 bp、2 つ挿入された場合、4.6.1 bp の断片が生じる。これら 4 種の条件をすべて満たす、すなわち、目的とする方向に  $1 \circ x P$  が 1 つ挿入された目的のプラスミド p A2L3L6099（図 5）を取得する。

【0043】⑤ p Adex2L3LCAwt の作製  
p Adex1CAwt を、Csp45I（東洋紡製）で切断し、次いで、同反応液中で BamHI、さらに EcoRI で切断した後、アガロースゲル電気泳動によるチェックを行う。2.1 kb の DNA 断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルから DNA 断片を回収する。なお、Csp45I および EcoRI による切断は 2.1 kb の BamHI DNA 断片を回収する際、他の断片が混入するのを防ぐためである。

【0044】p A2L3L6099 を BamHI で切断した後、フェノール：クロロホルム（1：1）処理を施

し、水層を TE で平衡化した Sephadex G25 によりゲル濾過する。回収した DNA 断片と前述の 2.1 kb の DNA 断片、ATP および T4 DNA リガーゼを含む反応液中で一晩結合させる。リガーゼを熱失活させた後、これをイン・ビトロ・パッケージングに用いる。

【0045】即ち、ラムダ・イン・ビトロ・パッケージングキットであるギガバック XL（Stratagene 製）を用い、残りは  $-80^{\circ}\text{C}$  に凍結する。ギガバック XL は 4.2 kb 以下のコスミドのパッケージ効率が低いのでインサートが入って大きくなつたコスミドをある程度選択することができる。本発明では、10 個のコロニーを拾えば大半はインサートを含んでおり、目的のクローン（ウイルスゲノムが正しく連結されたクローン）を容易に得ることができる。コスミドの扱い方については、常法（斎藤 泉他、実験医学：7：183-187, 1989）に従って行う。

【0046】パッケージングされたコスミドを大腸菌 DH5 $\alpha$ （Gibco BRL 製）に感染させる。即ち、Ap<sup>+</sup>（アンピシリン添加）寒天プレートと Ap<sup>+</sup> LB (poo1) に各種の濃度で接種し、一晩培養する。poo1 の miniprep DNA を抽出・調製し、制限酵素 Dra I 切断によりインサートがはいったものの割合を調べる。コロニーは丸ごと寒天ごと取り Ap<sup>+</sup> LB で一晩培養し、miniprep DNA を調製する。次に、各コロニーから調製したコスミド DNA の構造を Dra I 切断により確認する。目的とする方向に挿入された場合 8.9.1 bp、逆方向に挿入された場合 1.4 kb の断片を生じる。これにより目的とするカセットコスミド p Adex2L3LCAwt を取得する。

【0047】(c) ( $1 \circ x P$  挿入コスミドの構築その 2)

p Adex2L3LCAwt の作製

## ① p UCA6065 の作製

p A60X99 を BamHI および Pst I により切断し、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、BsrGI 部位を含む 1.7 kb の DNA 断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルから DNA 断片を回収する。同様の操作により pUC19 を BamHI および Pst I により切断し、2.7 kb の断片を回収する。次に両断片をリガーゼ反応 buffer 中に加え、さらに ATP、T4 DNA リガーゼを加え、一晩結合させる。次いでこの反応混液を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  を形質転換し、得られた形質転換体からプラスミド DNA を調製し、目的とするプラスミド p UCA6065 を得る。

## ② p 2LA6065 の作製

p UCA6065 を BamHI および Af1III で切断し、7.8.0 bp の断片を調製し、また、同プラスミドを BamHI および BsrGI で切断し、3.6 kb の断片を調製する。これら両断片と  $1 \circ x P$  配列を含む下記のリンカーダNA（配列番号：5）を混合しリガーゼ反

応 *b u f f e r* 中に加え、さらにATP、T4DNAリガーゼを加え、一晩結合させる。次いでこの反応混液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ を形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、リンカーDNAが1つ挿入された、目的とするプラスミドp2LD6065を得る。

5'-CATGTAATT AAATCTGAG ATAACTTCGT ATAATGTATG CTA  
TACGAAG TTATACCGT  
3'-ATTAAA TTAGAGCTC TATTGAAGCA TATTACATAC GATATGC  
TTC AATATGCGCA  
ATTAAATGT AAAATAATG TACTAGAGAC ACTTTCAATA AAGGCA  
AATG CTTTTATT-3'  
TAAATTTACA TTTTTATTAC ATGATCTCTG TGAAAGTTAT TTCCGT  
TTAC GAAAATAAAC ATG-5'

【0049】③ pA2LA3L6099の作製

p2LD6065をBamHIおよびSfiI(あるいはBglI)により切断し、1.5kbの断片を調製する。また、pA2L3L6099をBamHIおよびSfiIにより切断し、約22kbの断片を調製する。次に両断片をリガーゼ反応 *b u f f e r* 中に加え、さらにATP、T4DNAリガーゼを加え、一晩結合させる。次いでこの反応混液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ を形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、目的とするプラスミドpA2LA3L6099を得る。

【0050】④ pAdex2LA3LCAw tの作製  
pAdex2L3LCAw t作製の際の⑤と同様の操作により、pA2LA3L6099とpAdex1CAwtからpAdex2LA3LCAw tを作製する。

【0051】(d) (1o x P挿入コスマドの構築その他)

pAdex2LD3LCAw tの作製

① pHSGA6065の作製

pA60X99をBamHIおよびPstIにより切断し、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、BsrGI部位を含む1.7kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収する。pHSG299(宝酒造)をBamHIおよびPstIにより切断し、同様の操作により2.7kbの断片を回収する。次に両断片をリガーゼ反応 *b u f f e r* 中に加え、さらにATP、T4DNAリガーゼを加え、一晩結合させる。次いでこの反応混液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ を形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、目的とするプラスミドpHSGA6065を得る。

【0052】② p2LD6065の作製

pHSGA6065をBsrGIおよびDraIで切断し4.4kbの断片を調製し、これと1o x P配列を含む下記のリンカーDNA(配列番号:6)を混合し、リガーゼ反応 *b u f f e r* 中に加え、さらにATP、T4

DNAリガーゼを加え、一晩結合させる。次いでこの反応混液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ を形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、リンカーDNAが1つ挿入された目的とするプラスミドp2LD6065を得る。

5'-GTACACTCTC GGGTGATTAT TTACCCCCAC CCTTGCGTC TGC  
GCCGATT TAAATCTCGA

3'-TGAGAG CCCACTAATA AATGGGGGTG GGAACGGCAG ACGCGC  
TAA ATTTAGAGCT

10 GATAACTTCG TATAATGTAT GCTATACGAA GTTATACGCG TATTAA  
AATC CGTTT-3'

CTATTGAAGC ATATTACATA CGATATGCTT CAATATGCGC ATAAAT  
TTAG GCAAA-5'

【0053】③ pA2LD3L6099の作製

p2LD6065をBamHIおよびSfiI(あるいはBglI)により切断し1.5kbの断片を調製する。また、pA2L3L6099をBamHIおよびSfiIにより切断し、約22kbの断片を調製する。次に両断片をリガーゼ反応 *b u f f e r* 中に加え、さらに

20 ATP、T4DNAリガーゼを加え、一晩結合させる。次いでこの反応混液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ を形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、目的とするプラスミドpA2LD3L6099を得る。

【0054】④ pAdex2LD3LCAw tの作製

pAdex2L3LCAw t作製の際の⑤と同様の操作により、pA2LD3L6099とpAdex1CAwtからpAdex2LD3LCAw tを作製する。

【0055】(e) アデノウイルスDNA-末端蛋白複合体(Ad5 d1X DNA-TPCおよびAdex1CANLacZ DNA-TPC)の調製

アデノウイルスDNAとしては、Ad5 d1X(I.Saito et al., J. Virology, vol. 54, 711-719 (1985))またはAdex1CANLacZを用いる。Ad5 d1XをHeLa細胞(Roux 10本分)に、Adex1CANLacZを293細胞にそれぞれ感染させ、培養を行う。調製方法は、特開平8-84589号公報(14欄8行~15欄8行)に記載されている。得られたAd5 d1X DNA-TPCまたはAdex1CA

40 NLacZ DNA-TPCを、次のステップの1o x P挿入組換えアデノウイルス作成のため、充分量のAgeIで2時間切断し、Sephadex G25カラムでゲル濾過後、-80°Cに保存する。

【0056】(f) 1o x P挿入組み換えアデノウイルスの作製

なお、NLacZは大腸菌LacZ遺伝子のN末端にSV40の核移行シグナルを付加したものである。

① 10%FCS添加DMEで培養した293細胞の6cm、10cmシャーレ各1枚用意する。

50 ②-1. (Ad5 d1X2L3LまたはAdex2L3

## L CAN L a c Zの作製)

発現ユニットを組み込んだ1 o x Pを挿入したコスミドp A d e x 2 L 3 L C A w t DNAの8 μ gとA g e Iで切断したA d 5 d 1 X DNA-TPCまたはA g e Iで切断したA d e x 1 C A N L a c Z DNA-TPCの1 μ gを混合し、セルフェクト(ファルマシア製)キットを用いて、6 cmシャーレ1枚にリン酸カルシウム法でトランスフェクションを行う。

## 【0057】②-2. (A d 5 d 1 X 2 L A 3 L またはA d e x 2 L A 3 L C A N L a c Zの作製)

発現ユニットを組み込んだ1 o x Pを挿入したコスミドp A d e x 2 L A 3 L C A w t DNAの8 μ gとA g e Iで切断したA d 5 d 1 X DNA-TPCまたはA g e Iで切断したA d e x 1 C A N L a c Z DNA-TPCの1 μ gを混合し、セルフェクト(ファルマシア製)キットを用いて、6 cmシャーレ1枚にリン酸カルシウム法でトランスフェクションを行う。

## 【0058】②-3. (A d 5 d 1 X 2 L D 3 L またはA d e x 2 L D 3 L C A N L a c Zの作製)

発現ユニットを組み込んだ1 o x Pを挿入したコスミドp A d e x 2 L D 3 L C A w t DNAの8 μ gとA g e Iで切断したA d 5 d 1 X DNA-TPCまたはA g e Iで切断したA d e x 1 C A N L a c Z DNA-TPCの1 μ gを混合し、セルフェクト(ファルマシア製)キットを用いて、6 cmシャーレ1枚にリン酸カルシウム法でトランスフェクションを行う。

【0059】③ ②-1～②-3の組換えウイルスの分離と高力価ウイルス液の作製は、特開平8-84589号15欄36行～16欄35行に記載の方法に従う。ただし、判定期間を15～25日に変更したことを除く。

【0060】ここで得られる1 o x P挿入組換えアデノウイルスA d 5 d 1 X 2 L 3 L、A d 5 d 1 X 2 L A 3 L、A d 5 d 1 X 2 L D 3 L等と、目的の外来遺伝子発現ユニットを含むコスミドを用いて、公知の組換えアデノウイルス作製方法、例えばC O S - T P C法(「実験医学別冊」バイオマニュアルシリーズ4、遺伝子導入と発現・解析法、羊土社(1994)、43～58頁)に従って、目的の外来遺伝子発現ユニットと1 o x Pが挿入された組換えアデノウイルスを作製することができる。

【0061】(2) 次に、プロモーター、リコンビナーゼ遺伝子およびポリA配列を有する組換えバキュロウイルスの製造方法について説明する。以下に、リコンビナーゼ遺伝子としてリコンビナーゼC r e 遺伝子を使用した場合について述べるが、他のリコンビナーゼ遺伝子の場合もほぼ同様である。

【0062】① 特開平8-84589号12欄18行～14欄7行に記載の方法により、C A Gプロモーターのクローニング部位にC r e 遺伝子を挿入したカセットコスミドを作製し、制限酵素P m e Iで消化し発現ユニ

ットを含む断片を回収する。ベクターp A c Y M 1をE c o R VとB a m H Iで消化しポリヘドリンプロモーター領域を取り除き、K l e n o w酵素を用いて平滑化し、さらにアルカリフィオスフアーティゼ処理を施した後、前述の断片と混合し、T 4 DNAリガーゼで結合させ、この反応液を用いて大腸菌J M 1 0 9株を形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、目的とするプラスミドを得る。

② 前記プラスミドと直鎖状バキュロウイルスDNAを10混合して、リポフェクチン法によりS f細胞にトランスフェクションし、3日後の上清を適当に希釈してブラークアッセイする。ブラークアッセイを繰り返すことにより、純化したクローニングを得る。

③ 純化したウイルスクローニングを次第にスケールアップして増やし、高い感染価のストックを調製する。次に、ショ糖密度勾配遠心分離法により目的のC r e 発現用組換えバキュロウイルスを精製する。

(3) 最後に、E 2 A遺伝子欠失組換えアデノウイルスの製造方法について説明する。

① (1)～③および(2)～③のウイルスをそれぞれm o i = 1 0 および1 0 0 で2 9 3細胞に感染させ、培養を行う。4日めに細胞を回収し、前述の方法によりDNAを回収する。

② 1 o x Pで挟まれた領域(E 2 A遺伝子を含む)が切り出された構造を有するA d e x d 1 2 3 C A N L a c Zの生成を次の方法で確認する。回収したDNAをS m a I消化の後、ゲル電気泳動し、1 o x Pで挟まれた領域が切り出されて生じる4. 7 k bのバンドとA d e x 2 L 3 L C A N L a c Z、およびA d e x d 1 2 3 C A N L a c Zにおいて共通して見られる4. 45 k bのバンドの濃さの比較から、回収した組換えアデノウイルス中のA d e x d 1 2 3 C A N L a c Zの比率を求めること。

【0063】本発明の方法により上記のようにして得られる、目的の外来遺伝子発現ユニットを有し、E 2 A遺伝子の機能が完全に欠失した本発明の組換えアデノウイルスの高力価ウイルス溶液は、適宜希釈して局所注入(中枢神経系・門脈など)、経口(腸溶剤を用いる)投与、経気道投与、経皮投与等の投与方法により感染させ、遺伝病を含む各種疾患の治療に用いることができる。

## 【0064】

【実施例】以下、実施例、参考例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例等によりなんら限定されるものではない。なお、実施例中のファージ、プラスミド、DNA、各種酵素、大腸菌、培養細胞などを取り扱う諸操作は、特に断らない限り、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual. T. Maniatis編、第2版(1989)、Cold Spring Harbor Laboratory」に記載の方法に準じて行った。また、DNA制限

酵素および修飾酵素は、宝酒造、New England Biolabs (NEB) 社、Stratagene 社又はBoehringer 社から購入し、製造者指示書に従って使用した。

【0065】実施例1 (pAdex1CAwtの構築)

① CAGプロモーターを含むプラスミドpCMwCH31の構築

CAGプロモーターを含むプラスミドpCAGGS (Niwaら, Gene, 108, 193-200(1990)) をEcoRIで切断した後、Klenow酵素により平滑化し、SwaI リンカーとのリガーゼ反応を行った。次に、得られたプラスミドをSalIで切断した後、Klenow酵素により平滑化し、ClaI リンカーとのリガーゼ反応を行った。さらに、得られたプラスミドをPstIで切断した後、Klenow酵素により平滑化し、Xhol リンカーとのリガーゼ反応を行った。元の制限酵素部位の消失および各リンカーの挿入は各制限酵素切断の後、アガロースゲル電気泳動により確認した。

【0066】② pAdex1cの構築

(i) E1遺伝子領域を欠失したアデノウイルスゲノム左側末端の17%を含むプラスミド (pUAF0-17D) の調製

5型アデノウイルスDNAをS1処理して平滑末端とし、その平滑末端にBamHI リンカーを結合させ、その後HindIII 消化し、目的のフラグメント (2.8 kb、アデノウイルスゲノムの左側末端の8%に当たる) をアガロースゲル電気泳動で分離・回収し、BamHI/HindIII 部位へ挿入した。得られた目的のプラスミドをpUAF0-8と名づけた。

【0067】(ii) アデノウイルスDNAをHindII I 消化し、アガロースゲル電気泳動で分離し、目的の3.4 kbのフラグメント (アデノウイルスゲノムの左側末端の8-17%に当たる) をゲルから回収し、pUC19のHindIII 部位へ挿入した (pUAF8-17と命名)。pUAF0-8の塩基番号 (ここでいう塩基番号はアデノウイルスDNA由来) 454番目のPvuII部位をClaI リンカーを用いてClaI 部位に変換した。そして、このプラスミドをBamHI/ClaI 消化し、454 bpのBamHI-ClaI フラグメントをアガロースゲル電気泳動で回収した。pUAF8-17の塩基番号3328番目のBglII部位をClaI リンカーを用いてClaI 部位に変換した。そしてこのプラスミドをHindIII/ClaI 消化し、2.9 kbのHindIII-ClaI フラグメントをアガロースゲル電気泳動で回収した。pUAF0-8由来の454 bpのBamHI-ClaI フラグメントと、pUAF8-17由来の2.9 kbのHindIII-ClaI フラグメントをつなぎ、pUC19のBamHI/HindIII 部位へ挿入した。得られたプラスミドをpUA

F0-17Dと命名した。このプラスミドはE1遺伝子領域を欠失したアデノウイルスゲノム左側末端の17%を含む。

【0068】(iii)アデノウイルスゲノムのBst1107-EcoRI フラグメント (21.6 kb) の調製 5型アデノウイルスDNAをBst1107とEcoRIで消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した後、目的の21.6 kbのフラグメントを回収した。

【0069】(iv) アデノウイルスゲノムのEcoRI-SalI フラグメント (6.5 kb) の調製

pX2S (I. Saito et. al., J. of Virology, vol. 54, p711-719, 1985) のSalI 部位をSwaI リンカーを用いてSwaI 部位へ変換し pX2Wを得た。pX2WをEcoRIとSwaIで消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した後、目的の6.5 kbのフラグメントを回収した。

【0070】(v) シャロミド (chdRBR7-11) の調製

charomid9-11 (I. Saito & G. Stark, Proc. Natl.

20 Acad. Sci. U.S.A., vol. 83, p8664-8668, 1986) のKpnI、SmaI、BamHI を除くため、charomid9-11をAsp718とBamHIで消化し、Klenow酵素で平滑化後、セルフライゲーションした。これを用いて形質転換し、目的のシャロミドを単離し、charomid6-11と名づけた。charomid6-11のEcoRI 部位へBamHI リンカーを挿入し、得られたシャロミドをchdRBR7-11と名づけた。

【0071】(vi) pAdex1cの調製

pUAF0-17DのBamHI-Bst1107 フラグメント (2.9 kb) とアデノウイルスゲノムのBst1107-EcoRI フラグメント (21.6 kb) とpX2WのEcoRI-SalI フラグメント (6.5 kb) をEcoRIとEcl36Iで消化したchdRBR7-11とライゲーションした。その後、in vitroパッケージングし、大腸菌DH5 $\alpha$ へ感染させた。形質転換株から目的のフラグメントをもつものを単離し、pAdex1cと名づけた。

【0072】③ カセットコスミドpAdex1cwの構築

40 ClaI (20unit) で切断した後エタノール沈殿により回収したpAdex1c (1 $\mu$ g) と、5'末端リン酸化を施した下記の合成リンカー (1) (配列番号: 2) 0.01 $\mu$ g (SwaI、ClaI、SalI、NruI 部位を含む) を混合し、ATP、T4DN Aリガーゼを含む反応液 (最終容量18 $\mu$ l) 中で一晩結合させた。70°Cで10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた後、SwaI (20unit) を添加し、反応させた。この切断はリンカーが複数個挿入されたものからSwaI 断片を切り出し、リンカーが1個のみ挿入された構造のコスミドを得るために

行った。次に、反応液を *Spun column* (Pharmacia製) にかけ、リンカー由来の小断片を除去した後、ATP、T4DNAリガーゼを含む反応液(最終容量18μl)中で一晩結合させ、セルフアニーリングにより環状化を行った。70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させ、1μlをイン・ビトロ・パッケージングに用いた。次に、各コロニーから調製したコスミドDNAの構造をBamHIおよびNruI同時消化により確認した。目的とする方向に挿入された場合483bp、逆方向に挿入された場合、464bpの断片を生じる。この確認により目的とするカセットコスミドpAdex1caw(図1)を取得了。

## 合成リンカー

(1) 5'-CGATTAAATCGATTGTCGACTCGCGA-3'  
3'-TAAATTAGCTAACAGCTAGCGCTGC-5'

## 【0073】④ カセットコスミドpAdex1pCawの構築

①で構築したプラスミドpCMwCH31を HindII およびClaIで同時消化し、Klenow酵素により平滑化し、5'末端リン酸化を施したPmeIリンカーとのリガーゼ反応を行った。70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた後、Psp1406Iを添加し、反応させた。この切断はリンカーが複数個挿入されたものからPsp1406I断片を切り出し、リンカーがDNA断片の両端にそれぞれ1個連結した構造の断片を得るために行った。このあと、反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、2.3kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収した。次に、pAdex1cawをClaIで切断した後、生じた小断片をSpun column (Pharmacia製)により除去した後のDNA断片1μgと前述の2.3kbのDNA断片0.1μgをATP、T4DNAリガーゼを含む反応液(最終容量18μl)中で一晩結合させた。70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた後、これの1/4量にClaIを添加し(最終容量20μl)、セルフアニーリングにより生じた環状コスミドを切断した。1μlをイン・ビトロ・パッケージングに用いた。次に、各コロニーから調製したコスミドDNAの構造をBamHIおよびXhoI同時消化により確認した。目的とする方向に挿入された場合483bpと4.8kb、逆方向に挿入された場合、2.7および2.5kbの断片を生じる。この確認により目的とするカセットコスミドpAdex1pCawを取得了。

## 【0074】⑤ カセットコスミドpAdex1cawt(細胞工学、Vol.13、No.8、P759)の構築

SwaI(20unit)で切断した後エタノール沈澱により回収したpAdex1pCaw(1μg)と、5'末端リン酸化を施した下記の合成リンカー(2)(配列

番号: 3) (0.01μg) (ClaI、XbaI、SphI、PacI、SwaI、ClaI部位を含む)を混合し、ATP、T4DNAリガーゼを含む反応液(最終容量18μl)中で一晩結合させた。70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた後、PacI(20unit)を添加し、反応させた。この切断はリンカーが複数個挿入されたものからPacI断片を切り出し、リンカーが1個のみ挿入された構造のコスミドを得るために行った。次に、反応液をSpun column (Pharmacia製)にかけ、リンカー由来の小断片を除去した後、ATP、T4DNAリガーゼを含む反応液(最終容量18μl)中で一晩結合させ、セルフアニーリングによる環状化を行った。70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた1μlをイン・ビトロ・パッケージングに用いた。次に、各コロニーから調製したコスミドDNAの構造をXbaIおよびXhoI同時消化により確認した。目的とする方向に挿入された場合552bp、逆方向に挿入された場合、568bpの断片を生じる。これを確認することにより目的とするカセットコスミドpAdex1CAwt(図2)を取得了。

合成リンカーの構造

(2) 5'-ATCGATTCTAGACTAGTTAATTAAATTAAATCGAT-3'  
3'-TAGCTAAGATCTGATCAAATTAAATTAAATCTGCTA-5'

【0075】実施例2 (loxP挿入コスミドの構築)

① pA60X99Xの作製

pAdex1CAwt(0.5μg)をBamHI(15unit)を含む反応系20μl中で切断した後、熱処理(70℃、15分間)によりBamHIを失活させた。次にその1/4量を用いリガーゼ反応buffer中でATP、T4DNAリガーゼを加え、最終容量20μlで一晩結合させた。次いでこの反応混液10μlを用いて大腸菌DH5αを形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、目的とするプラスミドpA60X99Xを得た。

【0076】② pA60X99Xの作製(アデノウイルス以外のXbaI部位を除去する)

pA60X99X(5μg)をXbaI(10unit)を含む反応系50μl中で5分間反応させ、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、2ヶ所のXbaI部位のうち1ヶ所のみで切断された23.8kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収した。次に、この断片0.2μgをKlenow酵素(宝酒造製)5unitを含む反応系50μl中で反応させ両末端を平滑化し、さらに、これの1/5量、ATPおよびT4DNAリガーゼを含む反応液(最終容量20μl)中で一晩結合させた。次いでこの反応混液10μlを用いて大腸菌DH5αを形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製した。これらのプラスミドDNAをBsrGIおよびXb

a I で同時消化し、6. 2 k b の断片を生じる、すなわち図1の構造を有するプラスミドp A 6 0 X 9 9 (図3)を得た。

【0077】③ p A 2 L 6 0 X 9 9 の作製 (B s r G I 部位への 1 o x P の挿入)

p U L L 2 r (30 μg) を X h o I (150 unit) を含む反応系 125 μl 中で切断した後、熱処理 (70°C、15分間) により X h o I を失活させた。続いて K l e n o w 酵素 (宝酒造製) 12 unit を含む反応系中で両末端を平滑化し、その後フェノール:クロロホルム (1:1) 处理を施した後、エタノール沈澱した。沈澱物を遠心分離により取得し、10 mM トリス-塩酸 (pH 7.5) に 1 mM の EDTA を添加した溶液 (TE) 60 μl に溶解した。次に、これの 1/2 量と 5' 末端リン酸化 K p n I リンカーゼ (宝酒造製) 0.2 μg、ATP および T 4 DNA リガーゼを含むリガーゼ反応液 (最終容量 50 μl) 中で一晩結合させた。次に、熱処理 (70°C、15分間) によりリガーゼを失活させた後、A s p 7 1 8 (100 unit) を含む反応系 80 μl 中で消化した。反応混液をアガロースゲル電気泳動し、1 o x P を含む 64 b p の DNA 断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルから DNA 断片を回収した。

【0078】なお、上記の p U L L 2 r は以下のようにして調製した。p U C 1 1 9 (宝酒造製) を制限酵素 E c 1 1 3 6 II で切断し、アルカリホスファターゼ処理を施した後、末端に M l u I 部位および X h o I 部位を有しこれが連結すると N r u I 部位を生じるように設計されている 1 o x P 配列を含む下記の合成 DNA 断片 (配列番号: 4) との ligation 反応を行い該合成 DNA 断片が 2 つ挿入されたプラスミド p U L L 2 r を得た。

5' -CGAACCGTATAACTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCTCG  
AGTCG-3'  
3' -GCTTGCATATTGAAGCATATCGTATGTAATATGCTCAATAGGC  
TCAGC-5'

(下線部分の配列が 1 o x P 部位である。)

【0079】一方、プラスミド p A 6 0 X 9 9 (10 μg) を B s r G I (50 unit) を含む反応系 50 μl 中で切断した後、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、23. 8 k b の DNA 断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルから DNA 断片を回収した。この DNA 断片 0.5 μg と前述の 1 o x P を含む 64 b p の DNA 断片 0.005 μg、ATP および T 4 DNA リガーゼを含むリガーゼ反応液 (最終容量 25 μl) 中で一晩結合させた。これの 1/2 量に滅菌水、B s r G I 反応 buffer を加えて 18 μl としてから、70°C で 10 分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた。さらに、20 unit の B s r G I を加え (最終容量 20 μl) 37°C で 1 時間反応させることによりセルフアニーリングにより生じた環状の p A 6 0 X

9 9 を切断した。次いでこの反応混液 10 μl を用いて大腸菌 D H 5 α を形質転換し、得られた形質転換体からプラスミド DNA を調製した。

【0080】挿入された 1 o x P の方向を確認するため、A p a I と M l u I の同時消化を行い、反応混液をアガロースゲル電気泳動した。目的とする方向に挿入された場合、366 および 219 b p、逆方向に挿入された場合、334 および 251 b p の断片が生じる。また、N r u I で消化した場合、目的とする方向に挿入された場合 573 b p、逆方向に挿入された場合、533 b p の断片が生じる。さらに、D r a I と K p n I で同時消化した場合、目的とする方向に 1 o x P が 1 つ挿入された場合 320 b p、2 つ挿入された場合、384 b p の断片が生じる。これら 3 種の条件をすべて満たす、すなわち、目的とする方向に 1 o x P が 1 つ挿入された目的のプラスミド p A 2 L 6 0 X 9 9 (図4) を取得した。

【0081】④ p A 2 L 3 L 6 0 9 9 の作製 (X b a I 部位への 1 o x P の挿入)

p U L L 2 r (20 μg) を X h o I (100 unit) を含む反応系 100 μl 中で切断した後、熱処理 (70°C、15分間) により X h o I を失活させた。続いて K l e n o w 酵素 (宝酒造製) 8 unit を含む反応系において両末端を平滑化し、その後フェノール:クロロホルム (1:1) 处理を施した後、エタノール沈澱した。沈澱物を遠心分離により取得し、TE 30 μl に溶解した。これの全量と 5' 末端リン酸化 S p e I リンカーゼ (宝酒造製) 0.4 μg、ATP および T 4 DNA リガーゼを含む反応液 (最終容量 50 μl) 中で一晩結合させ、70°C で 10 分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた。さらに、S p e I (54 unit) を加え消化した後、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、1 o x P を含む 64 b p の DNA 断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルから DNA 断片を回収した。

【0082】一方、p A 2 L 6 0 X 9 9 (10 μg) を、X b a I (100 unit) を含む反応系 50 μl において切断した後、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、23. 8 k b の DNA 断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルから DNA を回収した。この DNA 断片 0.5 μg と前述の 1 o x P を含む 64 b p の DNA 断片 0.005 μg、ATP および T 4 DNA リガーゼを含む反応液 (最終容量 16 μl) 中で一晩結合させた。これに 5 倍希釈した TE 14 μl を加え、70°C で 10 分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた。次いでこれの 1/4 量に 20 unit の X b a I を添加し (最終容量 20 μl)、セルフアニーリングにより生じた環状の p A 2 L 6 0 X 9 9 を切断した。この反応混液 10 μl を用いて大腸菌 D H 5 α を形質転換し、得られた形質転換体からプラスミド DNA を

調製した。

【0083】挿入された $\text{I o x P}$ の方向を確認するため、 $\text{B g I II}$ と $\text{M I u I}$ の同時消化を行い、反応混液をアガロースゲル電気泳動した。目的とする方向に挿入された場合、366および503bp、逆方向に挿入された場合、398および471bpの断片が生じる。また、 $\text{A p a I}$ と $\text{M I u I}$ で同時消化した場合、目的とする方向に挿入された場合660bp、逆方向に挿入された場合、628bpの断片が生じる。 $\text{E c o N I}$ と $\text{M I u I}$ で消化した場合、目的とする方向に挿入された場合311bp、逆方向に挿入された場合、343bpの断片が生じる。さらに、 $\text{H p a I}$ と $\text{S a c I}$ で同時消化した場合、目的とする方向に $\text{I o x P}$ が1つ挿入された場合397bp、2つ挿入された場合、461bpの断片が生じる。これら4種の条件をすべて満たす、すなわち、目的とする方向に $\text{I o x P}$ が1つ挿入された目的のプラスミド $\text{p A 2 L 3 L 6 0 9 9}$ (図5)を取得した。

【0084】⑤  $\text{p A d e x 2 L 3 L C A w t}$ の作製  $\text{p A d e x 1 C A w t}$ (10 $\mu\text{g}$ )を、 $\text{C s p 4 5 I}$ (40unit)を含む反応系100 $\mu\text{l}$ 中で切断し、次いで、同反応液中に $\text{B a m H I}$ (30unit)、さらに $\text{E c o R I}$ (40unit)を順次添加した。21kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収した。なお、 $\text{C s p 4 5 I}$ および $\text{E c o R I}$ による切断は21kbの $\text{B a m H I}$  DNA断片を回収する際、他の断片が混入するのを防ぐためである。

【0085】 $\text{p A 2 L 3 L 6 0 9 9}$ (5 $\mu\text{g}$ )を、 $\text{B a m H I}$ (30unit)を含む反応系50 $\mu\text{l}$ 中で切断した後フェノール：クロロホルム(1:1)処理を施し、水層をTEで平衡化した $\text{S e p h a d e x G 2 5}$ によりゲル滻過した。回収したDNA断片0.5 $\mu\text{g}$ と前述の21kbのDNA断片0.5 $\mu\text{g}$ 、ATPおよびT4DNAリガーゼを含む反応液(最終容量18 $\mu\text{l}$ )中で一晩結合させた。70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた後、1 $\mu\text{l}$ をイン・ビトロ・パッケージングに用いた。

【0086】即ち、ラムダ・イン・ビトロ・パッケージングキットであるギガバックXL(*S tr a t a g e n e*社製)を1/4スケールで用い、残りは-80℃に凍結した。ギガバックXLは42kb以下のコスミドのパッケージ効率が低いのでインサートが入って大きくなつたコスミドをある程度選択することができる。本実験では、10個のコロニーを拾えば大半はインサートを含んでおり、目的のクローン(ウイルスゲノムが正しく連結されたクローン)を容易に得ることができた。コスミドの扱い方については、常法(斎藤 泉他、実験医学:7:183-187, 1989)に従って行った。

【0087】パッケージングされたコスミドを大腸菌 $\text{D H 5 \alpha}$ (*G i b c o B R L*)に感染させた。即ち、3枚

の $\text{A p}^+$ (アンピシリン添加)寒天プレートと5mlの $\text{A p}^+ \text{LB}$ (poo1)にそれぞれ1/200量、1/20量、1/2量、残り全量を接種し、一晩培養した。poo1のminiprepDNAを抽出・調製し、制限酵素 $\text{D r a I}$ 切断によりインサートがはいったものの割合を調べた。コロニーは丸ごと寒天ごと取り1.5mlの $\text{A p}^+ \text{LB}$ で、一晩培養し、miniprepDNAを調製した。次に、各コロニーから調製したコスミドDNAの構造を $\text{D r a I}$ 切断により確認した。目的とする方向に挿入された場合891bp、逆方向に挿入された場合1.4kbの断片を生じる。これにより目的とするカセットコスミド $\text{p A d e x 2 L 3 L C A w t}$ を取得了。

#### 【0088】実施例3

(アデノウイルスDNA-末端蛋白複合体( $\text{A d 5 d 1 X}$  DNA-TPCおよび $\text{A d e x 1 C A N L a c Z}$  DNA-TPC)の調製)アデノウイルスDNAとしては、 $\text{A d 5 d 1 X}$ (I. Saito et al., J. Virology, vol. 54, 711-719 (1985))または $\text{A d e x 1 C A N L a c Z}$ を用いた。特開平8-84589号公報14欄12行～15欄8行に記載の方法で、アデノウイルスDNA-末端蛋白複合体の調製を行った。得られた $\text{A d 5 d 1 X}$ および $\text{A d e x 1 C A N L a c Z}$  DNA-TPCを、第3ステップの組換えアデノウイルス作成のため、充分量の $\text{A g e I}$ で2時間切断し、 $\text{S e p h a d e x G 2 5}$ カラムでゲル滲過後、-80℃に保存した。

【0089】なお、DNA-TPCは制限酵素による切断、透析、ゲル滲過はできるが電気泳動・フェノール処理・エタノール沈澱はできない。濃縮法は塩化セシウム平衡遠心分離しかないのでなるべく濃厚状態に保った。10Rouxの感染細胞から約300 $\mu\text{g}$ 程度のDNA-TPCを得ることができた。一部を分取し、泳動用 $\text{B P B b u f f e r}$ を10 $\mu\text{l}$ 加えた後に、1 $\mu\text{l}$ のプロテイナーゼK(10mg/ml)を加えて37℃で10分間反応させて末端蛋白を消化した。フェノール抽出し、上清をアガロースゲル電気泳動で分離し、完全切断を確認した。 $\text{A g e I}$ 切断DNA-TPC中の制限酵素 $\text{b u f f e r}$ を、遠心ゲル滲過によって除いた後、分注し-80℃に保存した。

#### 【0090】実施例4

( $\text{I o x P}$ 挿入組み換えアデノウイルス( $\text{A d 5 d 1 X}$  2L3Lまたは $\text{A d e x 2 L 3 L C A N L a c Z}$ )の作製)なお、 $\text{N L a c Z}$ は大腸菌 $\text{L a c Z}$ 遺伝子のN末端にSV40の核移行シグナルを付加したものである。

① 10%FCS添加DMEで培養した293細胞の6cm、10cmシャーレ各1枚用意した。

② 発現ユニットを組み込んだ $\text{I o x P}$ を挿入したコスミド $\text{p A d e x 2 L 3 L C A w t}$  DNAの8 $\mu\text{g}$ と $\text{A g e I}$ で切断した $\text{A d 5 d 1 X}$  DNA-TPCまたは50 $\text{A g e I}$ で切断した $\text{A d e x 1 C A N L a c Z}$  DNA

—TPCの1  $\mu$  gを混合し、セルフェクト（ファルマシア製）キットを用いて、6 cmシャーレ1枚にリン酸カルシウム法でトランスフェクションを行った。6 cmシャーレのメディウムの上から混合液を滴下し、培養を続けた。一晩培養（約16時間）し、午前中に培養液を交換し、夕方、コラーゲンコート96穴3枚（原液・10倍希釈・100倍希釈）に、5%FCS添加DMEを用い、各ウエル当たり0.1 mlでまき直した。細胞数が各プレートで大きく違わないように、希釈2枚分には10 cmシャーレの293細胞を1/3ずつ混ぜて播いた。

【0091】③ 3~4日後と8~10日後に、各ウエルに50  $\mu$  lの10%FCS添加DMEを加えた。293細胞がやせてきたら早めに加えた。ウイルスが増殖し細胞が死滅したウエルが7~20日の間に現れた。ウエルの細胞が完全に死滅するごとに滅菌バストールピペットで培養液（死細胞ごと）を滅菌した1.5 mlチューブに無菌的に移して、ドライアイスで急凍して-80°Cに保存した。

④ 15~25日で判定は終了した。比較的遅く細胞が死んだウエルから回収した培養液チューブを約10個選び、超音波破碎後、5000 rpm 10分遠心分離して得られた上清を1次ウイルス液（first seed）として-80°Cに保存した。早めにウイルス増殖が起こったウエルは複数のウイルス株の混合感染の可能性が高いからである。

【0092】⑤ 24穴プレートに293細胞を用意し、5%FCS-DME (0.4 ml/ウエル) と1次ウイルス液10  $\mu$  lをそれぞれ2ウエルずつ添加した。

⑥ 約3日で細胞が完全に死滅したら、1ウエルは1次ウイルス液作製と同様に超音波破碎と遠心分離で上清を得、これを2次ウイルス液(second seed)として-80°Cに保存した。他の1ウエルの死滅した細胞を5000 rpmで5分間遠心分離し、上清を捨てて細胞だけを-80°Cに保存した（セルパック）。10種類のウイルス株のセルパックが集まつたら以下の方法で感染細胞の全DNAを抽出した。セルパックには、400  $\mu$  lのcell DNA用TNE (50mM Tris-HCl pH7.5, 100mM NaCl, 10mM EDTA)、4  $\mu$  lのproteinaseK (10mg/ml) および4  $\mu$  lの10%SDSを加えた。

【0093】⑦ 50°Cで1時間処理した後、フェノール・クロロホルム抽出2回、クロロホルム抽出2回、ついでエタノール沈殿により得られた核酸をRNAseを20  $\mu$  g/ml含む50  $\mu$  lのTEに溶かした。その15  $\mu$  lを発現ユニットを切断する酵素の中で認識配列にCGを含む酵素であるXba Iで切断し、発現コスミドカセットのXba I切断と共に、15 cm位の長さのアガロースゲルで一晩電気泳動を行い、パターンを比較した。Xba Iは挿入した1oxP配列内に認識部位があるので、1oxPが2個挿入された切断パターンを示す

クローンを選択する。説明できないバンドが薄く見えるクローンは、欠失のあるウイルスとの混合の可能性があるので廃棄した。

#### 【0094】実施例5

(Cre発現バキュロウイルスの作製)

##### (1) Sf細胞の培養

Sf細胞 (ATCC CRL 1711) は、Grace's 培地 (Gibco社) に13%のBacto Tryptose Broth (Difco社) を2%とウシ胎児

10 血清を10%添加した培地中、26.5°Cで培養した。必要に応じて無血清培地Ex-cell 1400 (LRHバイオサイエンシーズ社) なども使用可能である。培養ボトルはガラス製のボトル（フラット社製MAボトル）中で行い、継代にはトリプシンを使用せず、泡立てないようにボトルを揺すって細胞を剥がした。

#### 【0095】(2) バキュロウイルスDNAの調製

トランスフェクションに用いるバキュロウイルスDNAは野生型ではなく、LacZ遺伝子を組み込んだものをLacZ遺伝子領域内で1ヶ所Sau Iで切断して直鎖

20 状にしたものを用いた。これにより、組換えウイルスの出現効率を飛躍的に向上することができるばかりでなく、組換えウイルスの選別が容易にできた（図7）。LacZ遺伝子を組み込んだ組換えウイルスAcR P 23

21 1acZ (LacZ遺伝子を多角体プロモーターの下流に接続、ポッセ博士 (Dr. R. D. Possee, NERC Institute of Virology, UK) から分与) 感染後、2~3日の培養液 (200 ml) を5000×g、10分間遠心分離し、その上清液を25000×g、60分間遠心分離してペレットを回収し、次にこれを50%のショ糖クッショ

30 ニンにのせ、ウイルスをペレットダウンし、1.6 mlのTE緩衝液 (pH 8.0) に浮遊後、0.4 mlの1ysis緩衝液 (10% sodium N-lauroyl sarcosinate, 1mM EDTA) を加え、60°Cで20分間加熱した。これを臭化エチジウム溶液 [TE緩衝液 (pH 8.0) 中に100  $\mu$  g/ml臭化エチジウムを溶解] で溶かした54%CsClに重層し、100000×gで18時間遠心分離した。開鎖状、閉鎖状の2本のバンドが認められるが、両方とも回収し、水飽和ブタノールで臭化エチジウムを除き、TE緩衝液で一晩0°Cで透析した。次に、

40 この精製ウイルスDNAをSau Iで切断して直鎖状にした。

#### 【0096】(3) Cre発現バキュロウイルスの作製

CAGプロモーターのクローニング部位にCre遺伝子を挿入したカセットコスミド（特開平8-84589号公報）をPme Iで消化し発現ユニットを含む断片を回収した。ベクターpACYM1 (J. Gen. Virol. 68, 1233-1250, 1987) (図6) をEco RVとBam HIで消化し、ポリヘドリンのプロモーター領域を取り除き、Klenow酵素を用いて平滑化し、さらにアルカリホスファターゼ処理を施した後、前述の断片と混合し、T

4リガーゼ(宝酒造)を用いてリガーゼ反応を行った。さらに、この反応混液を用いて大腸菌JM109株(ATCC53323)を形質転換した。アンピシリン(100μg/m1)を添加したLB寒天プレートから形質転換株を拾い、目的のプラスミドを得た。このプラスミド1μgと(2)で得た直鎖状バキュロウイルスDNA20ngを滅菌水を加えて8μlにした。それに滅菌水で2倍希釈したリポフェクチン(Gibco社)を等量加えて室温で15分間静置後、血清無添加のGrace's培地(Gibco社)に置き換えた1×10<sup>6</sup>個のSf細胞へ接種し培養した。24時間後、通常の10%FCS添加培地に交換した(「実験医学別冊」バイオマニュアルシリーズ4、遺伝子導入と発現・解析法、羊土社(1994)、142~150頁)。

【0097】(4)組換えウイルスの選別  
トランسفエクションして3日後、1×10<sup>6</sup>個のSf細胞を35mmのディッシュに用意し、適当に希釈したウイルス液を接種する。1時間吸着後、ウイルス液を捨て、重層寒天培地を2ml加える。重層した培地が固まつた後、1mlの培養液をさらに重層した。27℃で3~4日間培養後、0.01%ニュートラルレッドおよび0.04%X-galを添加したPBSを1.0ml加えて染色した後、白いブラークをキャピラリーで抜き取り(親ウイルスは青色)、少量の培養液に浮遊させた。これをよく攪拌してウイルスを溶出させ、軽く遠心分離後、上清液を希釈してブラークアッセイを行った。同一ディッシュ中に青いブラークがなくなるまで繰り返し、純化したクローンAcCALacZを得た(図7)。

【0098】(5)組換えバキュロウイルスAcCANCreの大量調製  
純化したウイルスAcCANCreを次第にスケールアップして増やし、高い感染価のストックウイルスを調製した(10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup>pfu/ml)。次に、実施例5(2)に記述した方法により、組換えバキュロウイルスAcCANCreを精製した。即ち、組換えウイルス感染後、2~3日の培養液を5000×g、10分間遠心分離し、その上清を25000×g、60分間遠心分離してペレットを回収し、次にこれを50%のショ糖クッショングリセロールにのせ、ウイルスをペレットダウンし、適量のTE緩衝液(pH8.0)に懸濁した。このウイルス液は4℃で数年間保存が可能である。

#### 【0099】実施例6

(E2A遺伝子欠失組換えアデノウイルスの作製と構造確認)組み換えアデノウイルスAdex2L3CANLacZおよびCre発現バキュロウイルスAcCANCreをそれぞれmoi=1.0および100で293細胞に感染させ、培養を行った。なお、Cre発現バキュロウイルスAcCANCreが産生するNCreは、NLacZと同様、SV40の核移行シグナルをCreの

N末端に付加したものである。4日目に細胞を回収し、前述の方法によりDNAを調製した。10xPで挟まれた領域(E2A遺伝子を含む)が切り出された構造を有するAdex123CANLacZの生成を次の方法で確認した。

#### 【0100】SmaI消化

SmaI消化の後、ゲル電気泳動した結果、10xPで挟まれた領域が切り出されて生じる4.7kbの断片が認められた。このバンドとAdex2L3LCANLacZ、およびAdex123CANLacZにおいて

10共通して見られる4.45kbのバンドの濃さの比較から、回収した組換えアデノウイルス中の約10%がAdex123CANLacZであることが分かった。

#### 【0101】実施例7

(LacZ発現バキュロウイルスAcCALacZ(CAGプロモーター制御下)の作製および293細胞への導入)

##### (1)バキュロウイルスDNAの調製

実施例5(2)と同様の方法でバキュロウイルスDNAを調製した。

#### 【0102】(2)組換えバキュロウイルスAcCALacZの作製

CAGプロモーターのクローニング部位にLacZ遺伝子を挿入したカセットコスミドpAdex1CALacZ(特開平8-84589号公報)をPmeIで消化し発現ユニットを含む断片を回収した。ベクターpAcYM1(J. Gen. Virol. 68, 1233-1250, 1987)(図6)をEcoRVとBamHIで消化し、ポリヘドリンのプロモーター領域を取り除きKlenow酵素を用いて平滑化し、さらにアルカリホスファターゼ処理を施した後、前述の断片と混合し、T4リガーゼ(宝酒造)を用いてリガーゼ反応を行った。さらに、この反応混液を用いて大腸菌JM109株(ATCC53323)を形質転換した。アンピシリン(100μg/m1)を添加したLB寒天プレートから形質転換株を拾い、目的のプラスミドを得た。このプラスミド1μgと(1)で得た直鎖状バキュロウイルスDNA20ngを滅菌水を加えて8μlにした。それに滅菌水で2倍希釈したリポフェクチン(Gibco社)を等量加えて室温で15分間静置後、血清無添加のGrace's培地(Gibco社)に置き換えた1×10<sup>6</sup>個のSf細胞へ接種し培養した。24時間後、通常の10%FCS添加培地に交換した。図7においてCre遺伝子のかわりにLacZ遺伝子を用いた。

30【0103】(3)組換えウイルスの選別  
実施例5(4)と同様の方法で、純化したクローンAcCALacZを得た。

【0104】(4)LacZ発現バキュロウイルスAcCAA  
LacZの293細胞への導入

96穴プレートに293細胞をまき、1ウエルあたり約5010<sup>5</sup>細胞になった時点でLacZ発現バキュロウイルスA

31

c CALacZを moi 1, 10, 100, 500 になるように添加し、37℃で1時間インキュベートした。最終容量 100 μL になるように培地を添加し、37℃で2日間インキュベートした後、X-gal染色を行った。顯 \*

|        |   |    |     |     |
|--------|---|----|-----|-----|
| moi    | 1 | 10 | 100 | 500 |
| 効率 (%) | 3 | 40 | 100 | 100 |

## 【0105】

【発明の効果】本発明の組換えバキュロウイルスを使用することにより、目的の組換えアデノウイルスの分離、精製が容易になる。

## 【0106】

## 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：34

配列の型：核酸

## 配列

ATAACTTCGT ATAGCATACA TTATACGAAG TTAT

32

\* 微鏡下で青色に染まっている細胞と染まっていない細胞を数えることにより LacZ 発現バキュロウイルスベクター導入効率を算出した。

## 【0107】配列番号：2

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

## 配列

CGATTAAAT CGATTGTCGA CTCGCGA

## 【0108】配列番号：3

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

## 配列

ATCGATTCTA GACTAGTTA ATTAATTAA ATCGAT

## 【0109】配列番号：4

配列の長さ：52

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（一部Genomic DNA を含む任意の

## 配列

CGAACGCGTA TAACTTCGTA TAGCATAACAT TATACGAAGT TATCTCGAGT CG

34

★配列の種類：他の核酸（合成された任意のDNA）

ハイポセティカル配列：YES

20 アンチセンス：NO

配列の特徴

★ 特徴を決定した方法：S

27

★配列の種類：他の核酸（合成された任意のDNA）

ハイポセティカル配列：YES

アンチセンス：NO

配列の特徴

★ 特徴を決定した方法：S

36

◆ DNA)

ハイポセティカル配列：YES

アンチセンス：NO

起源：大腸菌ファージP1 DNA

配列の特徴

◆ 特徴を決定した方法：S

## 【0110】配列番号：5

配列の長さ：119

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（一部Genomic DNA を含む任意の

## 配列

CATGTAATT AAATCTCGAG ATAACCTCGT ATAATGTATG CTATACGAAG TTATACGCGT 60

ATTTAAATGT AAAATAATG TACTAGAGAC ACTTTCAATA AAGGCAAATG CTTTATT 119

## 【0111】配列番号：6

配列の長さ：115

配列の型：核酸

50 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（一部Genomic DNAを含む任意のDNA）

ハイポセティカル配列：YES

配列

GTACACTCTC GGGTGATTAT TTACCCCCAC CCTTGCCTGC TGCGCCGATT TAAATCTCGA 60

GATAACTTCG TATAATGTAT GCTATACGAA GTTATACGCG TATTAAATC CGTTT 115

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、コスミドpAdex1cwの構造を示す概念図である。

【図2】図2は、コスミドpAdex1CAwtの構造を示す概念図である。

【図3】図3は、プラスミドpA60X99の構造を示す概念図である。

【図4】図4は、プラスミドpA2L60X99の構造を示す概念図である。

\* アンチセンス：NO

起源：大腸菌ファージP1DNA

配列の特徴

\* 特徴を決定した方法：S

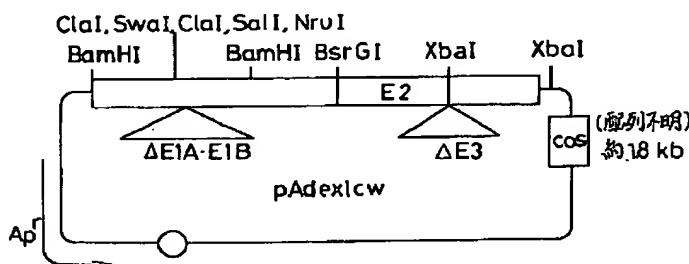
※ 【図5】図5は、プラスミドpA2L3L6099の構造を示す概念図である。

10 【図6】図6は、プラスミドpAcYM1の構造を示す概念図である。

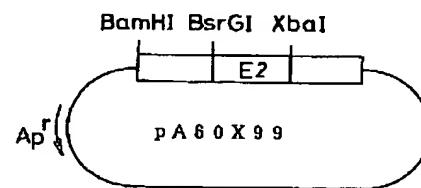
【図7】図7は、トランスファーベクターの作製とLacZを組み込んだ直鎖状バキュロウイルスDNAを用いる組換えバキュロウイルスの選別方法を示す概略図である。

※

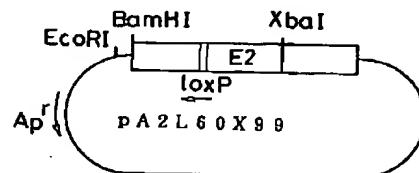
【図1】



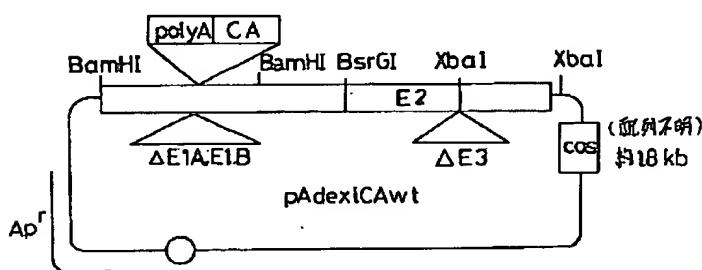
【図3】



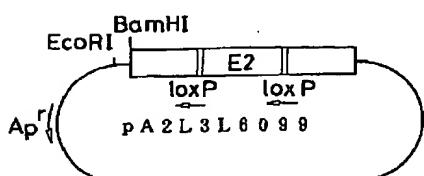
【図4】



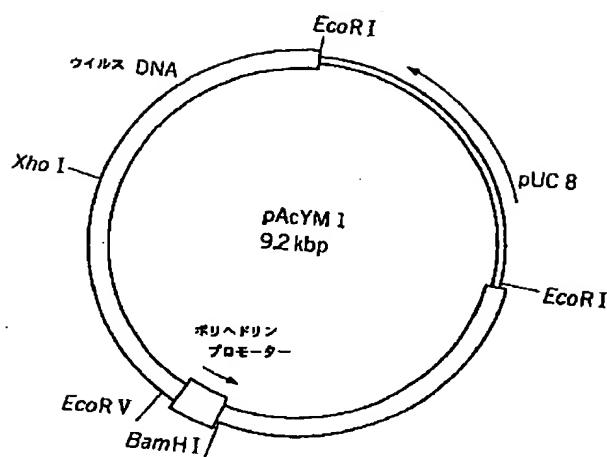
【図2】



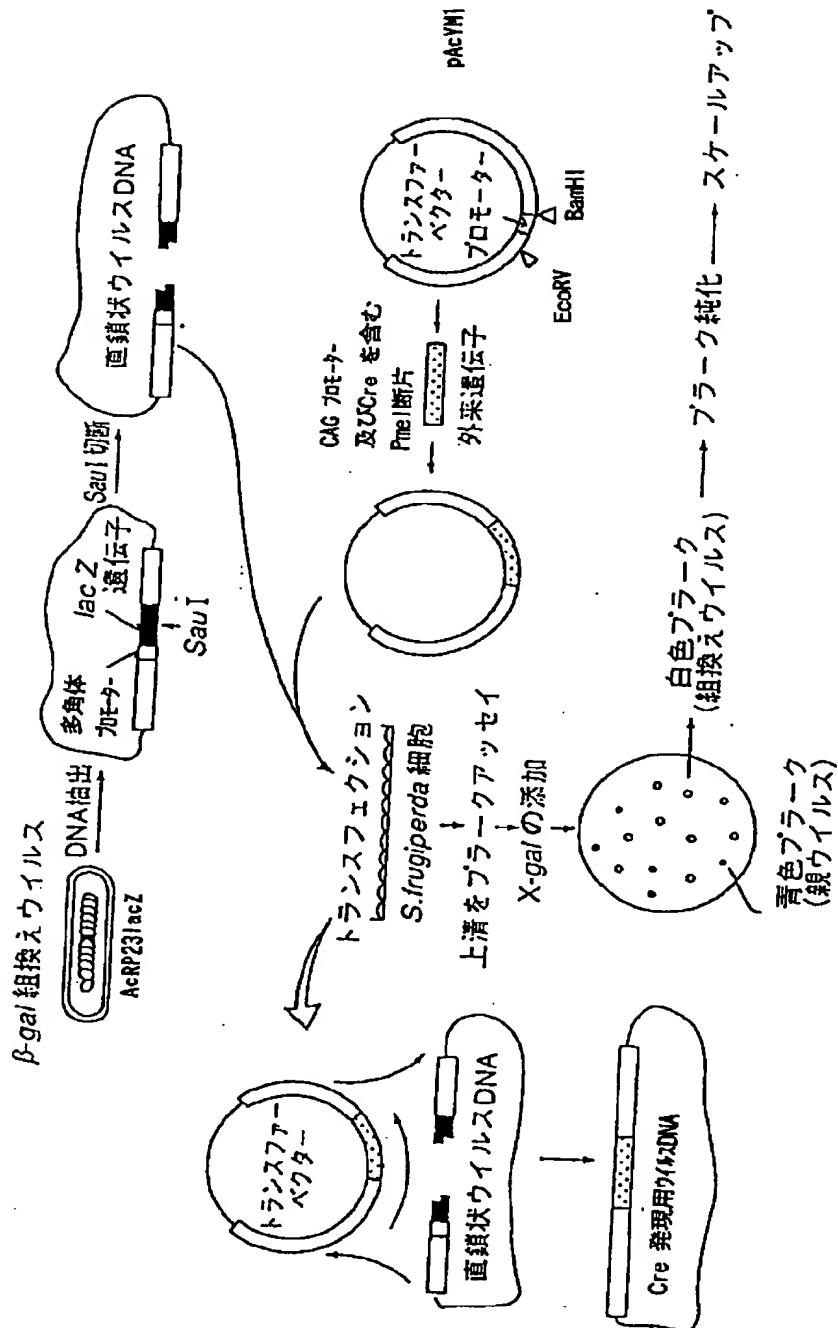
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

C 1 2 R 1:91

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(72) 発明者 斎藤 泉

東京都渋谷区代々木2丁目37番15-412号

(72) 発明者 宮村 達男

東京都杉並区浜田山4丁目21番22-113号